

**ESTUDIO MOLECULAR, MORFOLÓGICO Y FISIOLÓGICO DE
SEMILLA DE PAPAYA VARIEDAD MARADOL (*Carica papaya* L.)
ASOCIADO CON EL SEXO DE LAS PLANTAS**

VIOLETA ASPEITIA ECHEGARAY

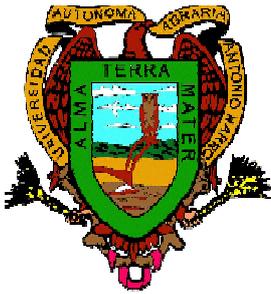
TESIS

Presentada como Requisito Parcial para

Obtener el Grado de:

MAESTRO

EN TECNOLOGÍA DE GRANOS Y SEMILLAS



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

Saltillo, Coahuila, México. Diciembre de 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

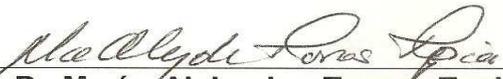
Que se Somete a Consideración del H. Jurado Examinador como
Requisito Parcial

Para Obtener el Título de:

Maestro en Tecnología de Granos y Semillas

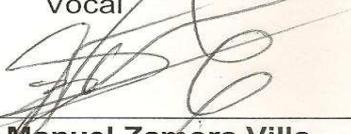
A P R O B A D A

Comité Particular


M. P. **María Alejandra Torres Tapia**
Presidente del Jurado


Dr. **Manuel Humberto Reyes Valdés**
Vocal


Dr. **Mario Ernesto Vázquez Badillo**
Vocal


Dr. **Víctor Manuel Zamora Villa**
Vocal


Dr. **Fernando Ruiz Zarate**
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Diciembre de 2012.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Por haberme acogido en sus aulas, por ser una institución tan noble y permitirme seguir preparándome. Fue un honor ser estudiante de la Narro y ahora es un orgullo ser egresada.

M.P. María Alejandra Torres Tapia

Por haber creído en el tema de investigación y haberme hecho parte de él, por darme la oportunidad de trabajar con usted, por haber guiado mi formación en la maestría de la forma correcta.

Dr. Manuel Humberto Reyes Valdez

Por el apoyo, la paciencia, los conocimientos y la amistad que me brindo en mi periodo de estudiante, por hacerme parte de su equipo de trabajo y enseñarme a trabajar de manera responsable y ordenada.

Dr. Mario Ernesto Vázquez Badillo

Por impulsar el desarrollo de mi formación profesional y darme el consejo de seguir estudiando, siempre cercano a sus alumnos y dispuesto a apoyar económica o moralmente cualquier trabajo de investigación, por su cariño y amistad.

Dr. Víctor Manuel Zamora Villa

Por su participación en la realización de este proyecto.

M.C. Martha Gómez Martínez

Por enseñarme a trabajar de manera limpia y ordenada, enseñarme a hacer las cosas bien para no repetirlas, a tomarles importancia a los detalles.

L.C.Q. Dulce Victoria Mendoza Rodríguez

Por hacer tuyas mis frustraciones y mis alegrías, por ser una compañera infalible, por los conocimientos, por ser mi cómplice incansable. Gracias por esas horas que llegaste antes de tú hora de entrada y te fuiste después de tú hora de salida, por tus faltas en las juntas del sindicato y pese a la huelga el estar atenta de nuestro material genético.

A la empresa Red Starr.

Por el material genético que aportó para esta investigación. Con un cariño especial al M.V. Nazario Rodríguez Guerra por haber hecho de mí la Ingeniero que soy e introducirme en este maravilloso tema de investigación "Papaya variedad Maradol".

A la empresa Semillas del Caribe.

Por haber apoyado económicamente la parte molecular de este trabajo y con material genético e instalaciones de alto nivel la parte morfológica y fisiológica. Gracias en especial al Sr. Francisco Mora Echegaray, Ing. Roberto García Padilla y Lic. Francisco Mendoza Garibay por su lealtad y amistad.

A mis maestros.

Dr. Norma A. Ruíz Torres, M.C. Federico Facio Parra, M.C. Socorro Bahena García, L.C.Q. Magda Medina y M.P. Víctor M. Villanueva Coronado por los conocimientos transmitidos durante mi periodo de estudiante.

A mis amigos.

Que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional: Leonarda Montes Alvarado, Sergio H. Hernández, Erick Arroyo, J. Antonio García Andrade, Luis V. Gómez Cepeda, Juan de Dios Hernández Quintero, Reyna Rojas, Livier Guizar Guzmán y Fabiola Garrido Cruz.

A mis amigas M. Dessire Davila Medina, Beatriz E. Treviño Cueto, Elvia López Cárdenas e Inés Rodríguez por su participación activa en mi trabajo de tesis y sus buenos consejos, las admiro por ser mujeres muy lindas e inteligentes.

A mis amigos del alma: Juan M. Ruiz Nieves, Helia de la Rosa Betancourt, Eida G. Vázquez y Celene Ríos Valtierra por recibirme en sus hogares y tratarme como a una hermana el tiempo en el que viví en Saltillo.

¡Gracias a ustedes!

DEDICATORIA

A mi madre Agustina Echegaray Santana.

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, por los ejemplos de trabajo y dignidad que la caracterizan y que me ha infundado siempre y por el valor mostrado para salir adelante. Mamá gracias por darme una carrera para mi futuro pero más que nada por tu amor incondicional.

A Tin y Marielita Aspeitia García.

Por ser mi fuente de energía, mis infalibles amigos de aventuras y participar indirectamente en la elaboración de esta tesis. Deseo de todo corazón ser un buen ejemplo para ustedes y que un día se conviertan en profesionistas para que tengan un futuro prospero y lo más importante que sean personas felices y plenas como lo es su tía Viole.

A mi maestro José Sánchez M.

Por impulsar el desarrollo de mi formación profesional, por enseñarme a admirar y amar la especialidad de semillas y a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro antes de estudiar en ella, por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado, por su tiempo compartido, por su cariño y amistad.

Violeta .

RESUMEN

Carica papaya es considerada una especie trióxica con flores masculinas, femeninas y hermafroditas en plantas separadas, estas últimas producen frutos con las mejores características comerciales y de importancia económica. El sexo de las plantas solo puede ser determinado hasta que los individuos llegan a la floración (de dos a tres meses después de la siembra). El presente estudio se desarrolló con el objetivo de evaluar la morfología (forma, color, textura, características propias, diámetro polar y ecuatorial) y fisiología (viabilidad, germinación y sexo de plantas) de las semillas extraídas de 60 frutos de papaya variedad Maradol, identificando el sexo en diferentes plantas para propósitos de identidad temprana y asociarlos con la fisiología de la semilla, así como estudiar parte de su genoma mediante marcadores moleculares que discriminan entre los tres sexos que presentan las plantas de papaya de la misma variedad; evaluando material vegetal de dos plantas machos, 23 hermafroditas y 17 hembras extraídas y previamente sexadas en campo.

En los resultados se encontró que la semilla de papaya variedad Maradol tienen características morfológicas similares en su forma ovoide, un color marrón oscuro en su estado de madurez, testa pétreo, cuentan con un diámetro polar entre 5 y 6 mm y diámetro ecuatorial entre 4 y 4.5 mm. Pero presentan características particulares que hacen una gran tipografía de morfologías en las semillas, dando lugar hasta 13 tipos de formas considerando la cubierta seminal, forma de rafe, número de pliegues o surcos en la testa, las cuales hacen difícil tener una descripción morfológica general de la semilla de papaya variedad Maradol. Ninguno de los 13 tipos de formas de semilla encontrados en los frutos de papaya obtuvo el 100 % de plantas hermafroditas, femeninas o masculinas, por lo tanto, con el estudio morfológico de las semillas no se puede determinar el sexo de las plantas de *C. papaya* variedad Maradol.

Por otra parte, Dos juegos de iniciadores para marcadores tipo SCAR, T12 y W11, amplificaron bandas de 800 pb con especificidad completa en plantas hermafroditas de la variedad Maradol, sin casos de falsos positivos. Por lo tanto pueden ser usados como base para implementar un método rápido de identificación del sexo en esta variedad, con fines de selección de plántulas.

Palabras clave: *Carica papaya*, sexo, variedad Maradol, marcadores moleculares, semilla, cubierta seminal, morfología, viabilidad.

ABSTRACT

Carica papaya is considered a kind trioica with male flowers, female and hermaphrodite on separate plants, the latter produce fruit with the best business features being economically important, to identify the sex of plants can only be determined until individuals reach the flowering (two to three months after planting). This study was conducted in order to evaluate the morphology (shape, color, texture, characteristics, polar and equatorial diameter) and physiology (viability, germination and plant sex) of seeds taken from 60 fruits of papaya variety Maradol identifying sex in different plants for early identification purposes and associate them with the seed physiology and study of their genome using molecular markers that discriminate between the three sexes having papaya plants of the same variety; evaluating plant material 2 floors males, 23 females and 17 hermaphrodites previously learned and sexed in the field.

The results found that papaya seeds have morphological variety Maradol similar in form ovoid, dark brown in its maturity, head stone, have a polar diameter 5 to 6 mm, equatorial diameter between 4 and 4.5 mm. But particular characteristics that make a big typography morphologies in seeds, leading up to 13 types of forms considering the seed coat, as raphe, number of folds or grooves in the head, which makes it difficult to have a general morphological description papaya seed variety Maradol. None of the 13 types of seed forms found in papaya fruits obtained 100% of hermaphrodite plants, male or female so the seed morphological study can not determine the sex of plants of *C. Maradol* papaya variety.

Moreover, two sets of primers for type SCAR markers, T12 and W11, 800 bp amplified bands with complete specificity hermaphroditic plants of the variety Maradol without false positive cases. Therefore they can be used as a basis for

implementing a rapid method for sex identification in this variety for selection of seedlings.

Key words: *Carica papaya*, sex, variety Maradol, molecular marke, seed, seed coat, morphology, viabi

ÍNDICE DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	12
1.1 Objetivo	2
1.2 Objetivos específicos.....	2
1.3 Hipotesis.....	¡Error! Marcador no definido.
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1 Antecedentes históricos de la papaya	6
2.2 Taxonomía de la papaya	6
2.3 Descripción botánica	7
2.4 Tipos de plantas	8
2.4.1 Plantas femeninas.....	8
2.4.2 Plantas masculinas.....	8
2.4.3 Plantas hermafroditas.....	9
2.5 Importancia económica.....	9
2.6 Contenido nutricional, valor nutritivo y principales usos	9
2.7 Origen de la variedad Maradol	10
2.8 Morfología de la semilla de papaya	10
2.9 Propagación de la planta de papaya	12
2.10 Genotipo y fenotipo.....	13
2.11 Genoma de la papaya.....	13
2.11.1 Segregación sexual.....	13
2.11.2 Marcadores moleculares para la discriminación de sexo ...	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1 Ubicación geográfica del área experimental.....	15
3.2 Material genético	15
3.3 Primer Estudio	16
3.4 Segundo Estudio	17
3.5 Parámetros evaluados.....	19
3.5.1 Características morfológicas	19
3.6 Pruebas fisiológicas.....	19
3.6.1 Prueba topográfica	19
3.6.2 Germinación	20
3.6.2.1 Plántulas Normales (PN).....	21

3.6.2.2 Plántulas Anormales (PA)	21
3.6.2.3 Semillas Sin Germinar (SSG).....	21
3.7 Diseño experimental y análisis estadístico	22
3.7.1 Diseño Experimental	22
3.7.2 Análisis Estadístico.....	22
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1 Primer Estudio	23
4.1.1 Características Morfológicas	23
4.1.2 Pruebas Fisiológicas	27
4.1.2.1 Viabilidad.....	27
4.1.2.2 Correlaciones entre el porcentaje de incidencia y la viabilidad	28
4.1.2.3 Germinación	29
4.1.2.4 Sexado de plantas.....	31
4.2 Segundo Estudio	33
V. CONCLUSIONES.....	40
VI. LITERATURA CITADA	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 3. 1 Juegos de iniciadores SCAR propuestos por Deputyet al., (2002) para tipos hawaianos de papaya.	18
Cuadro 4. 1 Características morfológicas encontradas en semillas de papaya var. Maradol y clasificadas en 13 tipos diferentes. 24	
Cuadro 4. 2 Correlación entre la incidencia y la actividad metabólica de los 13 tipos de características morfológicas encontradas en semillas de 60 frutos de papaya var. Maradol.	29
Cuadro 4. 3 Comportamiento de tres iniciadores de PCR para SCAR en plantas masculinas, femeninas y hermafroditas variedad Maradol.	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4. 1 Características morfológicas de semilla de papaya variedad Maradol con las características a) Tipo 1 Asimétrica Derecha; b) Tipo 2 Asimétrica Izquierda; c) Tipo 3 Rafe Ancho; d) Tipo 4 Rafe Deforme Derecha; e) Tipo 5 Rafe Deforme Izquierda; f) Tipo 6 Costillas Asimétricas; g) Tipo 7 Dextro Rafe; h) Tipo 8 Levo Rafe; i) Tipo 9 Pliegue Definido; j) Tipo 10 Tetra Plegada; k) Tipo 11 Penta Plegada; l) Tipo 12 Hexa Plegada; m) Tipo 13 Hepta Plegada.	24
Figura 4. 2 Respuesta del porcentaje de incidencia y comparación e medias de los 13 tipos de características morfológicas encontradas en semillas de 60 frutos de papaya var. Maradol.	25
Figura 4. 3 Respuesta del porcentaje de viabilidad de 13 tipos de semillas de papaya var. Maradol clasificadas por sus características morfológicas.	28
Figura 4. 4 Respuesta de la capacidad de germinación de 13 tipos de semilla de papaya variedad Maradol, expresado en porcentajes.	31
Figura 4. 5 Respuesta en porcentaje del sexado en plantas de papaya variedad Maradol. Fem (plantas femeninas); Herm (plantas hermafroditas).	32
Figura 4. 6 Resultado de amplificación con los iniciadores T1 y T12 en plantas Femeninas (F) y hermafroditas (H) de papaya variedad Maradol.	34
Figura 4. 7 Resultado de amplificación con los iniciadores T1 y W11 en plantas Femeninas (F) y hermafroditas (H) de papaya variedad Maradol.	34
Figura 4. 8 Resultado de amplificación con los iniciadores T1, T12 y W11 en plantas Masculinas (M); Femeninas (F); y hermafroditas (H) de papaya variedad Maradol.	35
Figura 4. 9 Resultado de amplificación en "Compuestos" de ADN proveniente de 5 plantas femeninas (F) y 5 plantas hermafroditas (H) con los iniciadores T1, T12 y W11.	35

I. INTRODUCCIÓN

México es uno de los principales exportadores de papaya, ya que envía a los mercados internacionales alrededor del 40% de la producción nacional; en 2011 hubo una producción nacional de 646 mil toneladas (SIAP, SAGARPA, 2012). Es en la actualidad una de las frutas de mayor consumo y muy popular por sus propiedades como digestivo (Gil y Miranda, 2005).

Urasaki *et al.* (2012) definen a *Carica papaya* como una especie trioica con flores masculinas, femeninas y hermafroditas en plantas separadas. Las plantas con flores hermafroditas son las que producen frutos con las mejores características comerciales: forma alargada y piel gruesa, lo cual le permite resistir más los daños mecánicos en poscosecha y una cavidad interna pequeña, es decir una mayor relación pulpa/semilla. Sin embargo, el sexo de las plantas de papaya solo puede ser determinado hasta que los individuos llegan a la floración (de dos a tres meses después de la siembra).

Para obtener una plantación con individuos hermafroditas, el productor de papaya Maradol debe sembrar de tres a cuatro plantas por punto de siembra y eliminar al momento de la floración los fenotipos no deseados, los cuales tienen una frecuencia esperada de 1/3. Esta práctica resulta en un aumento de

los costos de producción como consecuencia del mayor número de plántulas sembradas y el mantenimiento de las mismas hasta el momento de ser removidas. Además, requiere de personal capacitado que conozca bien la morfología floral de la papaya y sepa distinguir las flores hermafroditas de las femeninas (Saalau *et al.*, 2009).

Los caracteres morfológicos de las semillas han sido considerados de importancia por permitir establecer similitudes y diferencias (Leython y Jáuregui, 2008). Dichos caracteres no solo aportan rasgos diferenciales para el reconocimiento, sino también permiten explicar las relaciones entre su estructura y función (Perissé *et al.*, 2011); en las semillas de papaya, el color de la testa y forma de la raíz se han asociado con el tipo de sexo, por ejemplo las plantas femeninas se ha descrito que la testa es de color café claro y tiene una raíz ramificada, mientras las masculinas contienen la testa café oscuro y la radícula es recta. También se han hecho ensayos colorimétricos para el contenido de fenoles totales, estos pudieron distinguir las hembras (86%) de los machos (77%) pero no se pudo detectar hermafroditas. En otro estudio con papel cromatográfico se indicó que el ácido transcinámico es predominante en las hojas de las plántulas hermafroditas, pero las plántulas hembras y machos no pudieron ser diferenciadas (Magdalita y Mercado, 2003).

Por otro lado la investigación molecular ha permitido encontrar resultados positivos en la identificación de diferentes tipos de marcadores,

capaces de discriminar sexo en algunas variedades de papaya (Chaves-Bedoya *et al.*, 2009). Sin embargo a la fecha no se tienen reportes de una técnica probada en la variedad Maradol.

Si el sexo de papaya se pudiera identificar en estado de semilla o de plántula, se ahorrarían recursos como suelo, fertilizantes, agroquímicos, mano de obra y agua, además de que la producción sería más amigable con el ambiente.

1.1 Objetivo general

Estudiar los aspectos morfológicos y fisiológicos de la semilla de papaya variedad Maradol (*Carica papaya* L.) asociados con el tipo de sexo en plantas.

1.2 Objetivos específicos

1. Identificar las características morfológicas de la semilla de papaya variedad Maradol y la relación con su fisiología mediante pruebas topográficas con sal de tetrazolio y germinación.
2. Identificar el sexo en la producción de semillas de papaya variedad Maradol mediante la extracción de ADN localizando los marcadores moleculares que determinan sexo.

1.3 Hipótesis

- Al menos una de las características morfológicas de la semilla de papaya variedad Maradol tiene una relación con su fisiología reflejada en una de las pruebas fisiológicas evaluadas.

- En alguna etapa fenotípica en la producción de semillas de papaya variedad Maradol se podrá determinar el sexo mediante la extracción de ADN.
- Al menos un tipo de sexo de papaya puede ser descrito o tener relación con las características morfológicas y fisiológicas de la semilla.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes históricos de la papaya

Se considera que la papaya cultivada es de origen Americano, específicamente del sur de México y Costa Rica (Gil y Miranda, 2008). Descrita por primera vez por el cronista Fernández de Oviedo antes de 1535 en una carta a su Soberano, en ella decía haberla visto crecer en Centro América en la región comprendida desde las costas de Panamá hasta el sur de México (Flores-Sánchez, 2005).

2.2 Taxonomía de la papaya

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Violales

Familia: Caricaceae

Género: *Carica* L., 1753

Especie: *papaya* L., 1753

Nombre comunes: melón zapote, mamao, naimi, capaídso, fruta bomba, lechosa, mamón, nampucha y paque (SIOVM, 2012).

2.3 Descripción botánica

Es una planta herbácea alta, de crecimiento rápido y de vida corta aproximadamente de 15 a 30 años (Alonso *et al.*, 2009). El tallo mide entre 2 y 10 metros de altura y de 10 a 30 centímetros de diámetro y produce un látex lechoso. Presenta una raíz principal pivotante que puede desarrollarse hasta un metro de profundidad, las raíces secundarias se desarrollan en un radio de 80 cm y la mayor concentración de raíces absorbentes se encuentra en los primeros 20 cm. Sus hojas son de porte grande, crecen en forma simple, alternas y son palmeadas; el limbo de la hoja mide entre 25 y 75 cm y presenta de 7 a 10 lóbulos, el pecíolo llega a medir hasta 125 cm de longitud y su color puede variar según la variedad entre diferentes tonalidades de verde y a morado.

El tamaño de la fruta varía entre 100 g y 10 kg. Su forma va de redonda-ovalada hasta oblonga. La semilla de papaya consiste de un embrión pequeño, aplanado lateralmente y rodeado por el endospermo, así como una cubierta formada por una endotesta dura y de una sarcotesta traslucida que contiene un fluido delgado mucilaginoso. Las flores son de color blanco, nacen en el tallo, cerca de la inserción de las axilas de las hojas, poseen 5 pétalos y 5 sépalos. En la mayoría de casos la polinización de las flores femeninas y hermafroditas se da por el viento y otras veces por insectos. La papaya desarrolla 3 tipos de flores: flor femenina o pistilada, flor masculina o

estaminada y flor hermafrodita. (Augstburger *et al.*, 2000; Flores-Sánchez, 2005).

2.4 Tipos de plantas

De acuerdo al tipo de flor que presenta una planta, se conocen tres tipos de plantas: femeninas, masculinas y hermafroditas.

2.4.1 Plantas femeninas

Producen siempre flores femeninas, si en los alrededores no existen plantas hermafroditas o masculinas que provean polen, usualmente las plantas no producen frutos, aunque ocasionalmente se pueden producir sin polinización, fenómeno que es conocido como partenocarpia y los frutos no producen semillas.

2.4.2 Plantas masculinas

Se distinguen por formar un largo pedúnculo floral con muchas flores masculinas, las cuales por poseer un ovario rudimentario, que se puede volver funcional en algún momento, llegan a producir frutos.

2.4.3 Plantas hermafroditas

Tienen flores masculinas, hermafroditas o ambas, dependiendo de las condiciones ambientales y la época del año. Tiempo con temperaturas altas (arriba de 35°C) y baja humedad relativa provoca que la flor se vuelva hembra estéril (quedando como masculina). Este tipo de plantas tiende a producir semillas autopolinizadas, lo cual da como resultado una relativa uniformidad de la progenie sin que se originen plantas masculinas, solamente hermafroditas y femeninas.

2.5 Importancia económica

México, uno de los principales exportadores a mercados internacionales, alrededor del 40% de la producción nacional se exporta, registrando en 2011 una producción de 646 mil toneladas de fruta, solo en el estado de Colima se tienen sembradas mil 200 hectáreas, estimando una producción de 90 mil toneladas para 2012 (SIAP, SAGARPA, 2012). Es en la actualidad una de las frutas de mayor consumo y es popular por sus propiedades como digestivo (Gil y Miranda, 2005).

2.6 Contenido nutricional y principales usos

El fruto maduro contiene alrededor de 85% de agua, del 10 al 13% de azúcares y 0.6% de proteínas. Es rico en vitamina A y contiene cantidades significativas de vitaminas B1, B2 y C (Colima Produce, 2010). Por su

contenido de carpaína y otros alcaloides las hojas se utilizan en la industria farmacéutica (Augstburger *et al.*, 2000). El látex de los frutos inmaduros posee una enzima, la papaína, de naturaleza proteolítica, utilizada para ablandar carnes, aclarar bebidas y con fines medicinales e industriales (Colima Produce, 2010).

2.7 Origen de la variedad Maradol

La variedad Maradol fue obtenida a partir de germoplasma colectado en la región central y oriental de Cuba. Ha alcanzado gran difusión en México, se extiende por muchos países tropicales y constituye una de las tres variedades de papaya más comercializadas en el mundo. Posee un excelente aroma, color rojo salmón en la pulpa, sabor exquisito, consistencia carnosa de la epidermis debido a las pectinas presentes, mesocarpio grueso, madurez lenta, superficie lisa, resistencia a la transportación, manejo adecuado de post-cosecha y larga vida de anaquel (Rodríguez-Manzano, 2008).

2.8 Morfología de la semilla de papaya

Las semillas de papaya se encuentran en la cavidad central del fruto, siendo el producto del óvulo fertilizado, son de color negro y ovaladas, recubiertas por un mucilago, en número sobrepasan el medio millar en un fruto de regular tamaño. Su forma está determinada por el tipo de óvulo del que se han originado y su posición dentro del fruto, así como el tamaño está

determinado por la posición que guardan entre ellas dentro del fruto y por la cantidad de nutrientes que reciban durante su formación (Gil y Miranda, 2005). Se sabe que la elongación celular en la cubierta seminal está dirigida por el crecimiento del endospermo y es responsable del control del tamaño de la semilla; ocurriendo después de la fertilización cumpliendo un papel importante de desarrollar el tamaño de la semilla (García *et al.*, 2005; Ingouff *et al.*, 2006; Schruff *et al.*, 2006). Sin embargo, ni la posición de la semilla o su tamaño afecta la emergencia, expresión sexual y vigor de las plántulas de esta cultivo (Reboucas, 2000).

Como la semilla proviene de un primordio seminal con un solo tegumento la cubierta seminal es denominada testa. En *C. papaya* se tiene una cubierta con testa y tegmen siendo bitegumentada; a su vez, la testa se compone de tres capas; a) endotesta, parte más interna que cubre el tegmen, endosperma, cotiledones y embrión; b) mesotesta, compuesta de mesotesta externa e interna, llamadas esclerotesta; y c) sarcotesta o exotesta jugosa, estas estructuras (testa) rodean y protegen las partes internas de la semilla de daños físicos y bióticos procedentes del exterior (Gil y Miranda, 2005 y 2008; Reboucas, 2000). Durante el proceso de diferenciación de la semilla de papaya, el tegumento interno llega a comprimirse e impregnarse con pigmentos que le imparten la característica de color marrón (Nakaune *et al.*, 2005).

2.9 Propagación de la planta de papaya

En la actualidad, el método más práctico y comercial para su propagación es mediante el uso de semilla sexual, siendo la principal función que tiene una semilla en cualquier especie de producir nuevos individuos para su preservación; se extrae de frutos sanos y maduros de plantas hermafroditas. Urasaki *et al.* (2002) comentaron que el cruce de las plantas femeninas y masculinas resulta en una proporción de 1:1 de la progenie femenina y masculina. Del mismo modo, un cruce entre plantas hembras y hermafroditas resultó en una proporción de 1:1 de la progenie hembra y hermafrodita. Un cruce entre la hermafrodita y la planta masculina dio origen a la descendencia masculina, femenina y hermafrodita en una proporción 1:1:1. La autofecundación de plantas hermafroditas produjeron plantas hermafroditas y femeninas en una proporción 2:1 de ahí que los productores de semilla de papaya prefieran esta cruce.

La producción comercial de semilla se realiza en lotes aisladas para evitar la contaminación con polen de plantas masculinas o de otras variedades, en las que se utilizan únicamente plantas hermafroditas que se auto fecundan o se polinizan por acción de insectos o viento con polen de otras plantas hermafroditas de la misma plantación.

2.10 Genotipo y fenotipo

Se menciona que el genotipo se define como la constitución genética de un individuo, mientras que el fenotipo es la apariencia externa de un individuo, es decir las características visibles, por ejemplo color, tamaño, forma, resistencia a una enfermedad, etc.; este fenotipo está determinado por la interacción entre el genotipo y el ambiente. De tal forma, fenotipos diferentes pueden resultar de genotipos idénticos que crecen en distintos ambientes, pero es muy poco probable que dos individuos compartan todas sus características fenotípicas sin tener genotipos similares (Contreras, 2012). Sin embargo, es necesario estudiar los diferentes aspectos fenotípicos de las semillas y evaluar su relación con las características funcionales dadas por su constitución genética, ya que los recursos genéticos representan la materia prima de los fitomejoradores y son imprescindibles para los productores (Rodríguez-Manzano, 2009).

2.11 Genoma de la papaya

La especie *Carica papaya* posee un genoma pequeño de 372 megabases (Mb), contenido en nueve pares de cromosomas (Chaves *et al.*, 2009).

2.11.1 Segregación sexual

La segregación sexual en la papaya puede explicarse con un modelo de un locus con tres alelos: M , macho; M^h , hermafrodita; y m hembra, con los alelos M y M^h dominantes sobre m . Las hembras (mm) son homocigóticas

recesivas. Los machos (Mm) y hermafroditas ($M^h m$) son heterocigóticos. Las plantas hermafroditas producen típicamente un 25% de semillas no viables en sus frutos, porque todas las combinaciones de dos alelos dominantes (MM , MM^h y $M^h M$) son embriogénicamente letales.

Aunque el modelo anterior explica de forma satisfactoria las frecuencias de segregación típicas en papaya, investigaciones recientes señalan que la determinación del sexo es más compleja. Urasaki *et al.* (2012) sugieren que un complejo de genes en lugar de uno solo determinan el sexo de la papaya. Asimismo, el mapeo genético y la secuenciación de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) del genoma de la papaya han revelado la existencia de un par de cromosomas sexuales primitivos. El cromosoma sexual masculino primitivo controla la determinación sexual y se designa como Y, el cual se apareja con el cromosoma X. La región específica del macho en el cromosoma Y “MSY” (Male Specific Region) suprime la recombinación entre los cromosomas X y Y. En este sistema, el cromosoma Yh controla la determinación del sexo hermafrodita (Urasaki *et al.*, 2012).

2.11.2 Marcadores moleculares para la discriminación de sexo

Se han desarrollado marcadores moleculares estrechamente vinculados a Sex1, la región determinante del sexo en papaya. En particular tres productos de marcadores RAPD han sido clonados y secuenciados (Deputy *et al.*, 2002).

Con base en estas secuencias fueron sintetizados los iniciadores para marcadores SCARs denominados T1, T12 y W11 (Cuadro 1). Las combinaciones T12 y W11 amplificaron ADN en plantas hermafroditas y masculinas y sólo raramente en las hembras de los tipos hawaianos de papaya. Mientras tanto T1 amplificó en los tres tipos sexuales de plantas. Para su validación en una serie de variedades Deputy *et al.* (2002) utilizaron en promedio 3.42 plantas hermafroditas y 2.75 plantas femeninas por cultivar.

Por otra parte, Sánchez y Nuñez (2008) trabajaron con 52 muestras de papaya de cultivares colombianos en la región de Mosquera en Cundinamarca, Colombia. El marcador SCAR T1 amplificó bandas de 1,300 pb para plantas macho y hermafroditas, mientras que el SCAR W11 amplificó para macho y hermafroditas bandas de 800 pb, presentándose ausencia de bandas en las hembras.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en dos estudios, 1) estudio morfológico y fisiológico de las semillas extraídas de frutos de papaya y 2) estudio genético mediante marcadores moleculares que discriminan entre los tres sexos que presentan las plantas de papaya. Evaluando material vegetal de plantas machos, hermafroditas y hembras extraídas directamente de campo.

3.1 Ubicación geográfica del área experimental

La evaluación del primer estudio se realizó en el Laboratorio de Ensayos de Semillas “M.sc Leticia Alejandra Bustamante García” del Centro de Capacitación y Desarrollo de Tecnología de Semillas; mientras que el segundo estudio en el Laboratorio de Genomas pertenecientes al Departamento de Fitomejoramiento de la Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, situada geográficamente a 25° 22' Latitud Norte y una Longitud Oeste de 101°00' y la Latitud es de 1742 msnm.

3.2 Material genético

El material vegetal usado en el estudio fue recolectado en el año 2011, frutos de 280 días y hojas jóvenes de 42 plantas de un campo de cultivo comercial con papaya variedad Maradol destinada a la

exportación en el Rancho Amial, ubicado en el Municipio de Tecoman, Colima. Se localiza entre los paralelos 18°40' y 19°08' de latitud norte y los meridianos 103°37' y 103°59' de longitud oeste, con una altitud entre 0 y 1,200 m. La temperatura media anual es de 26.3 °C, con una precipitación media anual de 810.6 mm y humedad relativa de 85.5 %.

3.3 Primer Estudio

La semilla se extrajo de 60 frutos en punto de madurez fisiológica y comercial de 280 días de edad, fue lavada en agua corriente y mediante frotación en malla de plástico, removiendo y eliminando restos de sarcotesta que la recubre, fue secada a temperatura ambiente (25° C con 36% Humedad Relativa) por 5-7 días hasta alcanzar 6% en contenido de humedad. Se procedió al acondicionamiento de la semilla por separación por peso de impurezas, semilla vana y semilla llena (Semilla Pura), mediante un soplador South Dakota® de flujo de aire constante (abriendo el diafragma a 4 cm), considerando la semilla pura aquellas que se depositaron en la parte inferior de la columna del equipo.

La porción considerada semilla pura ó llena se evaluó una por una de acuerdo a sus características morfológicas, así como el tamaño y los diámetros polares y ecuatoriales. Una vez evaluadas y clasificadas según sus características morfológicas, se procedió a realizar una prueba topográfica con

2,3,5-trifenil tetrazolio al 1% y de germinación a cada uno de los tipos de semillas con características morfológicas similares. Con estas características se clasificó la semilla con los parámetros descritos por Gil y Miranda (2005).

3.4 Segundo Estudio

El número de muestras por sexo fue variable, de acuerdo con el material disponible en campo en el momento de la recolección, 2 plantas macho, 17 plantas hembras y 23 hermafroditas. Las hojas fueron desinfectadas con una solución 100 ppm de hipoclorito de sodio.

El ADN fue extraído de hojas jóvenes deshidratadas con base en el método Doyle y Doyle (1990). Para ello se pesaron 0.15 g de la muestra, se molió y colocó en un tubo Eppendorf; se añadieron 800µL de buffer de extracción (previamente calentado a 65°C por 10 min). Se incubó a 65°C por 30 min con agitación ocasional, se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 600µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), y se invirtió el tubo para formar una emulsión. Se centrifugó a 10,000 rpm por 5 min. Se pipeteó la fase acuosa y se transfirió a un nuevo tubo, después se añadió el volumen 1:1 de RNAsa y se incubó a 37°C por 40 min. Se añadieron 800µL de isopropanol (-20°C). Se dejó que el ADN precipitara a temperatura ambiente (aproximadamente 1 h), y se transfirió a un nuevo tubo con 400µL de solución de lavado (alcohol al 70% y acetato de sodio al 0.2M). Se agitó suavemente por

espacio de 20 seg y se desechó la solución de lavado. Se añadieron 400µL de etanol al 70% (-20°C), se agitó suavemente y se eliminó la solución. Por último se invirtió el tubo en sanitas para secar la pastilla (aproximadamente 1 h) y se procedió a disolver el ADN con T.E.

Para la reacción de polimerasa en cadena, se utilizaron los tres juegos de iniciadores reportados por Deputy *et al.*, (2002) (Cuadro 3.1). La reacción de PCR fue llevada a cabo para volúmenes de 20µL que contenían 4µL de ADN (a una concentración de 500ng/µL), 4µL de Taq-&GO (Mastermix 5xC, MP ®), 7.6 µL de agua, 2.2 µL de iniciador R y 2.2 µL de iniciador F.

Cuadro 3. 1 Juegos de iniciadores SCAR propuestos por Deputy *et al.*, (2002) para tipos hawaianos de papaya.

Iniciadores para PCR	
T1-F	5'-TGCTCTTGATATGCTCTCTG-3'
T1-R	5'-TACCTTCGCTCACCTCTGCA-3'
T12-F	5'-GGGTGTGTAGGCACTCTCCTT-3'
T12-R	5'-GGGTGTGTAGCATGCATGATA-3'
W11-F	5'-CTGATGCGTGTGTGGCTCTA-3'
W11-R	5'-CTGATGCGTGATCATCTACT-3'

La optimización de las temperaturas de la reacción se llevó al cabo en un termociclador Mini Cycler[™] TMMJ RESEARCH, INC ®. El mejor programa consistió de una temperatura inicial de desnaturalización de 95°C por 5 min y 25 ciclos con un perfil térmico para cada ciclo de 95°C por 60s, 60.1°C por 60s, 72°C por 60s;

luego de esto, un ciclo de extensión final a 72°C por 7 min. Los productos de la PCR fueron separados mediante electroforesis (70V durante 1 h y 15 min) en gel de agarosa al 1%, teñidos con 8 µL de GelRed (NucleicAcid Gel Stain, 10,000X 0.5ml, Biotium®). Las bandas fueron visualizadas en un transiluminador Transilluminator UVP®, y su tamaño se determinó con el marcador de 100-3000 pb (Ladder DNA marker, Axygen®).

3.5 Parámetros evaluados

3.5.1 Características morfológicas

Se evaluó cada una de las semillas extraídas de 20 frutos en tres repeticiones, clasificándolas de acuerdo a sus características morfológicas de color, forma y estructuras de la testa utilizando un estereoscopio marca Zeiss Stemi^{DV4®}, así como el tamaño, los diámetros polar y ecuatorial de la semilla con ayuda de un vernier tipo manual marca Scala^{INOX}.

3.6 Pruebas fisiológicas

3.6.1 Prueba topográfica

Para realizar esta prueba se utilizaron tres repeticiones de 25 semillas por cada tipo de características morfológicas encontrados, se puso a imbibir en agua las semillas por un tiempo de 24 horas, una vez transcurrido el tiempo, se seccionó cada semilla en forma longitudinal dejando los cotiledones visibles, se colocaron en tubos de ensayo envueltos con papel aluminio agregando una

solución de 2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio al 1 %, los tubos se colocaron en una incubadora a 35 ± 1 °C por un tiempo de dos horas.

La evaluación se realizó colocando cada una de las semillas en el estereoscopio, observando si los cotiledones se tiñeron de color rojo (indicando viabilidad en la semilla), expresado el dato en porcentaje. La metodología y evaluación se determinó en base a la ISTA, 2009.

3.6.2 Germinación

Se utilizó papel ancho de 25.5 cm de largo por 19 cm de ancho para la elaboración de los “tacos” de cada tipo de característica morfológica, humedeciéndolo con agua. Una vez humedecido, se colocó un papel sobre la mesa y se sembraron las 25 semillas acomodadas en la parte central de la hoja en forma equidistante, cubriéndose con otro papel húmedo y enrollándose hasta formar un “taco”, realizando tres repeticiones por cada tipo de características morfológica encontrada. Los “tacos” se colocaron en bolsas de polietileno y se llevaron a una cámara de germinación germinadora marca BIOTRONETE MARK III® a temperatura constante de 35 °C con 8 horas de luz y 16 horas de oscuridad. Se evaluaron a los 14 días plántulas normales y a los 21 días porcentaje de germinación, plántulas anormales y semillas muertas. El procedimiento se basó conforme a las reglas de la ISTA (2009).

3.6.2.1 Plántulas Normales (PN)

Se contabilizó aquellas plántulas que manifestaron un mejor desarrollo de sus estructuras esenciales; radícula e hipocotilo, tomándose como criterio un mínimo de dos centímetros para considerarse como plántula normal. Para obtener un porcentaje total de plántulas normales, se realizó la última evaluación a los 21 días de siembra.

3.6.2.2 Plántulas Anormales (PA)

Se evaluaron a los 21 días de la siembra. Se clasificó como plántulas anormales, aquellas que presentaron las siguientes características: pobre desarrollo de la raíz, estructuras esenciales deformadas (hipocotilo, raíz y cotiledones), necrosidad en alguna estructura esencial, etc. Los resultados fueron expresados en porcentaje.

3.6.2.3 Semillas Sin Germinar (SSG)

Se evaluaron a los 21 días de la siembra, considerando como semillas sin germinar aquellas que no tuvieron alguna modificación o cambios en su estructura, como romper la testa. Los resultados fueron expresados en porcentaje.

3.7 Diseño experimental y análisis estadístico

3.7.1 Diseño Experimental

El análisis estadístico se realizó con los valores que se obtuvieron del primer estudio; los resultados de las variables de los tipos de características morfológicas encontrados fueron establecidos y analizados con procedimientos acordes a un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones.

3.7.2 Análisis Estadístico

Los análisis de varianza y la pruebas de medias se realizaron mediante el paquete estadístico SAS Versión 9.0, (2002), con el siguiente modelo estadístico.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = la i-j esima variable observada.

μ = Efecto de la media general.

T_i = Efecto del i-ésimo tipo morfológico.

E_{ij} = Error experimental.

$i = 1, 2, \dots, n$ tipo.

$j = 1, 2, \dots, n$ repeticiones.

Las medias de cada variable se compararon mediante la prueba de Tukey al nivel de significancia al 0.05 %.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Primer Estudio

4.1.1 Características Morfológicas

El resultado del presente estudio de evaluación de las características morfológicas de semillas de los 20 frutos por repetición de papaya variedad Maradol, se lograron clasificar 13 tipos diferentes de semillas con características similares entre ellas, descritas a continuación en el Cuadro 4.1 y Figura 4.1.

Cuadro 4. 1 Características morfológicas encontradas en semillas de papaya var. Maradol y clasificadas en 13 tipos diferentes.

Tipo de semilla	Forma	Color	Textura	Característica propia	Diámetro polar (mm)	Diámetro ecuatorial (mm)
1 Asimétrica Derecha	Ovoide	Marrón oscuro	Rugosa pétrea	Surco lado derecho pasa por arriba del micrópilo	5.5 – 6.0	4.0 – 4.5
2 Asimétrica Izquierda	Ovoide	Marrón oscuro	Rugosa pétrea	Surco lado izquierdo pasa por arriba del micrópilo	5.5 – 6.0	4.0 – 4.5
3 Rafe Ancho	Ovoide	Marrón oscuro	Rugosa pétrea	Rafe ancho	5.0 – 6.0	4.0 – 4.5
4 Rafe Deforme Derecha	Ovoide	Marrón oscuro	Rugosa pétrea	Rafe deforme lado derecho, serie de protuberancias	5.0 – 5.5	4.0 – 4.5
5 Rafe Deforme Izquierda	Ovoide	Marrón oscuro	Rugosa pétrea	Rafe deforme lado izquierdo, serie de protuberancias	5.0 – 5.5	4.0 – 4.5
6 Costillas Asimétricas	Ovoide	Marrón oscuro	Rugosa pétrea	Dos surcos a lado del hilum arriba del micrópilo	5.0 – 5.5	4.0-4.5
7 Dextro Rafe	Ovoide	Marrón oscuro	Rugosa pétrea	Rafe en sentido opuesto manecillas del reloj	5.0 – 6.0	4.0 – 4.5
8 Levo Rafe	Ovoide	Marrón oscuro	Rugosa pétrea	Rafe en contra manecillas del reloj	5.0 – 5.5	4.0-4.5
9 Pliegue Definido	Ovoide	Marrón oscuro	Rugosa pétrea	Pliegue arriba del micrópilo e hilum, surco muy definido	5.0 – 6.0	4.0-4.5
10 Tetra plegada	Ovoide	Marrón oscuro	Rugosa pétrea	4 surcos arriba del micrópilo e hilum	5.5	4.5
11 Penta Plegada	Ovoide	Marrón oscuro	Rugosa pétrea	5 surcos arriba del micrópilo e hilum	5.5	4.3
12 Hexa Plegada	Ovoide	Marrón oscuro	Rugosa pétrea	6 surcos arriba del micrópilo e hilum	5.5	4.0
13 Hepta Plegada	Ovoide	Marrón oscuro	Rugosa pétrea	7 surcos arriba del micrópilo e hilum	5.5	4.5



Figura 4.1 Características morfológicas de semilla de papaya variedad Maradol con las características a) Tipo 1 Asimétrica Derecha; b) Tipo 2 Asimétrica Izquierda; c) Tipo 3 Rafe Ancho; d) Tipo 4 Rafe Deforme Derecha; e) Tipo 5 Rafe Deforme Izquierda; f) Tipo 6 Costillas Asimétricas; g) Tipo 7 Dextro Rafe; h) Tipo 8 Levo Rafe; i) Tipo 9 Pliegue Definido; j) Tipo 10 Tetra Plegada; k) Tipo 11 Penta Plegada; l) Tipo 12 Hexa Plegada; m) Tipo 13 Hepta Plegada.

En los diferentes tipos de semillas según sus características morfológicas encontradas, se muestra que existe una coincidencia en aspectos de fenotipo como la forma, el color y la textura de la testa; sin embargo, cada uno mostró una diferencia en el número de surcos, posición del surco, considerando como referencia al micrópilo y en algunos tipos alguna deformidad en la estructura del rafe de la semilla, como se muestra en el Cuadro 4.1; algo que llama la atención es el tamaño de la semilla, sobre todo el diámetro polar, entre mayor número de surcos presenta, la característica es más uniforme en el diámetro (5.5 mm) dado en los tipos 10 (Tetra Plegada), 11 (Penta Plegada), 12 (Hexa Plegada) y 13 (Hepta Plegada).

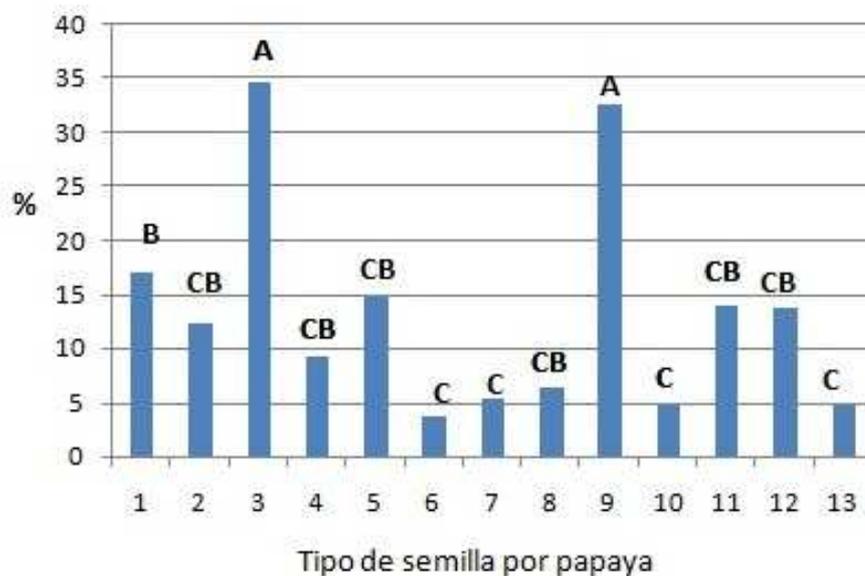


Figura 4. 2 Respuesta del porcentaje de incidencia y comparación de medias de los 13 tipos de características morfológicas encontradas en semillas de 60 frutos de papaya variedad Maradol.

En los resultados de porcentaje de incidencias de cada tipo de características morfológica encontrada en las semillas por fruto de papaya por repetición, destacan los tipos 3 (Rafe Ancho) con el 20.04 % y 9 (Pliegue Definido) con 18.88 %, quienes en la prueba de comparación se encontraron en el primer grupo estadístico (Figura 4.2); coincidiendo en todas sus características fenotípicas solo con la diferencia que el tipo 3 presenta un rafe ancho y bien definido y el tipo 9 presenta un pliegue o surco muy definido arriba del micrópilo; por lo que es probable que estas características morfológicas de semillas sean muy comunes de encontrar en los frutos de esta variedad.

Como se muestra en la Figura 4.2 el segundo grupo estadístico lo conforman los tipos 1, 2, 4, 5, 8, 11 y 12, con incidencias desde 6.3 hasta 14.6 %, donde destacan los tipos de Asimétrica Derecha, Asimétrica Izquierda, Penta Plegada y Hexa Plegada por coincidir dentro de sus características en la forma vertical del rafe. Dentro de este grupo algunos tipos formaron parte del tercer grupo estadístico como fueron 2, 4, 5, 8, 11 y 12; sin embargo, los tipos Costillas Asimétricas, Dextro Rafe, Tetra Plegada y Hepta Plegada complementaron a este grupo, pero con la menor frecuencia con 2.11 y 2.69 %, estos tipos comparten las mismas características fenotípicas, la única diferencia entre ellas es la característica propia, donde el tipo 6 (Costillas Asimétricas) presenta dos surcos al lado del hilium, tipo 10 (Tetra Plegada) presenta 4 surcos arriba del micrópilo e hilium y tipo 13 (Hepta Plegada) quien presenta 7 surcos arriba del micrópilo e hilium.

4.1.2 Pruebas Fisiológicas

4.1.2.1 Viabilidad

En la prueba topográfica con tetrazolio (Figura 4.3), los tipos que se presentaron con mayor incidencia en el fruto de papaya tuvieron diferentes respuestas en cuanto a viabilidad, mostrando la semilla del Tipo 3 (Rafe Ancho) un 100 % de viabilidad, mientras que en el Tipo 9 Pliegue Definido un 93.33 %, lo cual nos puede indicar que al menos este último tipo por su característica particular sea una malformación y afecte el funcionamiento de la viabilidad. Por el contrario, los tipos 1 (Asimétrica Derecha), 2 (Asimétrica Izquierda), 3 (Rafe Ancho), 6 (Costillas Asimétricas), 10 (Tetra Plegada), 11 (Penta Plegada) y 12 (Hexa Plegada) resultaron tener en sus estructuras un 100 % de viabilidad en la prueba topográfica con tetrazolio, sobresaliendo los Tipos 6 (Costillas Asimétricas) y 10 (Tetra Plegada), que a pesar de tener poca incidencia en cuanto a cantidad de semilla presente en el fruto de papaya lograron tener un alto valor de viabilidad, lo cual nos muestra que la incidencia de alguna característica morfológica por poca que sea, no puede dictaminar si es a causa de una malformación. Sin embargo, los tipos 4 (Rafe Deforme Derecha), 5 (Rafe Deforme Izquierda), 7 (Dextro Rafe) y 8 (Levo Rafe) obtuvieron los más bajos porcentajes de viabilidad, desde 62.5 hasta 80 %, teniendo un promedio de 74.3 % que en algunos tipos si coincide en la baja incidencia encontrada en los frutos, estos tipos de característica morfológica poseen el rafe deforme o tendiendo a vertical, lo que se tiene la posibilidad de poder apoyar en la confirmación de la malformación.

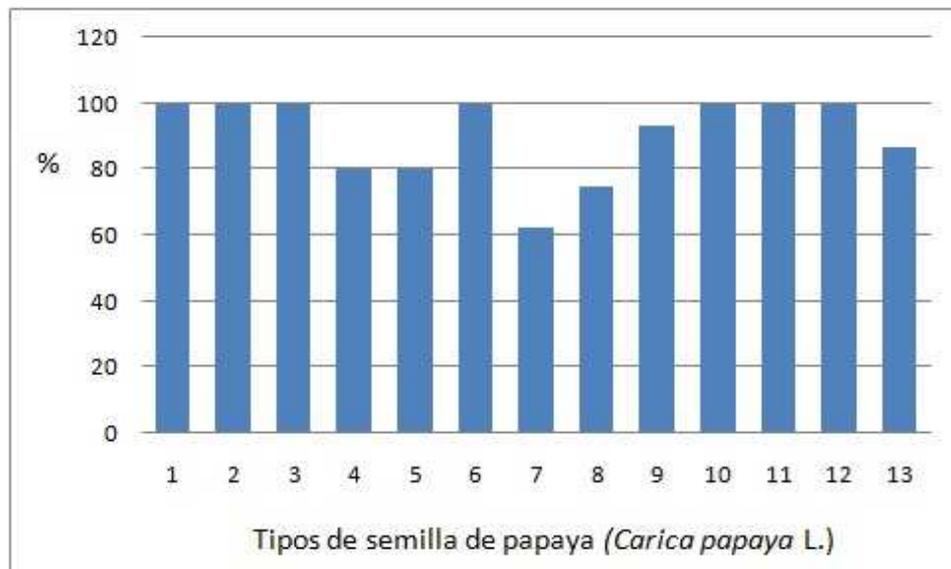


Figura 4. 3 Respuesta del porcentaje de viabilidad de 13 tipos de semillas de papaya variedad Maradol clasificadas por sus características morfológicas.

4.1.2.2 Correlaciones entre el porcentaje de incidencia y la viabilidad

Para conocer si existía alguna correlación entre las variables de porcentaje de incidencia por fruto de los 13 tipos de características de semillas y el porcentaje de la respuesta a la viabilidad se hizo una prueba de correlación de Pearson, esta prueba estadística indico que hay un coeficiente de correlación de 0.24, lo cual indica que entre estas dos variables no existe una correlación importante o bien que existe una correlación no significativa (Cuadro

4.2). Por lo tanto, nada tiene que ver la incidencia de las formas por fruto y la viabilidad que presenta cada tipo de semilla.

Cuadro 4. 2 Correlación entre la incidencia y viabilidad de los 13 tipos de características morfológicas encontradas en semillas de 60 frutos de papaya var. Maradol.

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación múltiple	0.249274063
Coefficiente de determinación R ²	0.062137558
R ² ajustado	0.036789925
Error típico	6.443854938
Observaciones	39

4.1.2.3 Germinación

Para poder observar cual fue el comportamiento de germinación en los tipos de semilla de papaya, se realizó una prueba de medias por (DMS) al 0.5 % de probabilidad, resultando que el primer grupo estadístico los conformaron 3 tipos morfológicos donde el tipo 1 (Asimétrica Derecha), 10 (Tetra Plegada) y 11 (Penta Plegada) obtuvieron valores de 100 % de germinación, como se muestra en la Figura 4.4. los tres tipos comparten las características de forma ovoide, color marrón oscuro, textura rugosa pétreo, diámetro polar de 5.5 mm y el rafe bien formado. Además de presentar 100 % en viabilidad. Puede ser que estas

características de la semilla sean las formas más aceptables para tener alta calidad fisiológica en la semilla por acumular mayor número de nutrientes; en un estudio de formas en el cultivo de soya hecho por Valle- Gallo (2008), se encontró que la forma esférica obtuvo porcentajes de solo 16 % de germinación, debido a la baja acumulación de reservas en los cotiledones.

El segundo grupo estadístico lo conforman los tipos 2 (Asimétrica Izquierda), 3 (Rafe Ancho), 4 (Rafe Deforme Derecha), 5 (Rafe Deforme izquierda), 12 (Hexa Plegada) y 13 (Hepta Plegada) con un 86.6 % de germinación, los 6 tipos de semilla comparten las características de forma ovoide, color marrón oscuro y textura rugosa pétrea. El tercer grupo estadístico está conformado únicamente por el tipo 9 (Pliegue Definido), este tipo presenta una forma ovoide, color marrón oscuro, textura rugosa pétrea, un pliegue arriba del micrópilo e hilium un diámetro polar entre 5-6 mm y un diámetro ecuatorial de 4-4.5 mm. Los valores más bajos de germinación lo obtuvieron los tipos 6 (Costillas Asimétricas), 7 (Dextro Rafe) y 8 (Levo Rafe), este grupo comparte las características de forma ovoide, color, marrón oscuro y textura rugosa, esto nos podría dar una idea de que las características de forma, color y textura son propias de la especie *C. papaya* variedad Maradol.

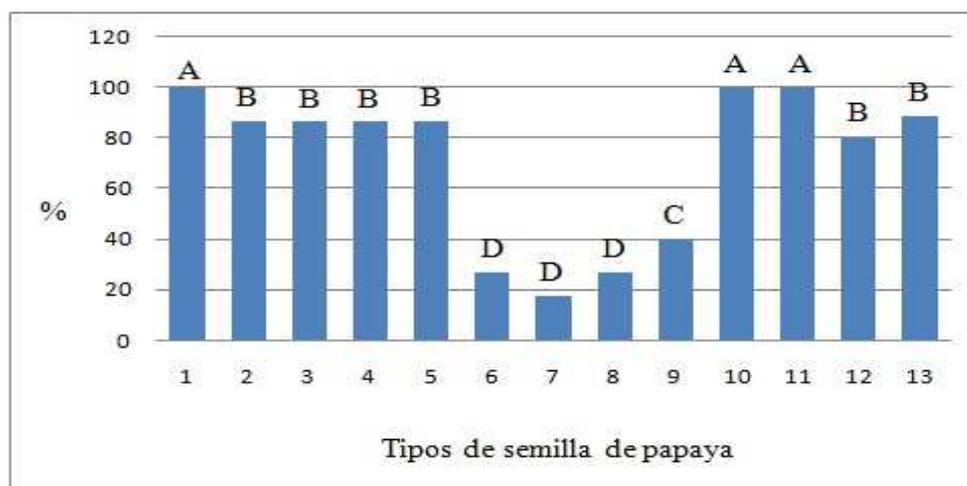


Figura 4. 4 Respuesta de la capacidad de germinación de 13 tipos de semilla de papaya variedad Maradol, expresado en porcentajes.

4.1.2.4 Sexado de plantas

A los 90 días de la siembra en invernadero se obtuvieron los botones florales de las plantas de cada tipo de semilla, en el tipo 1 (Asimétrica Derecha), el 90 % de la floración correspondió a plantas hermafroditas y el 10 % a plantas femeninas; 2 (Asimétrica Izquierda), 80 % plantas hermafroditas, 20 % plantas femeninas; 3 (Rafe Ancho), 70 % plantas hermafroditas, 30 % plantas femeninas; 4 (Rafe Deforme Derecha), 60 % hermafroditas 40 % femeninas; 5 (Rafe Deforme Izquierda), 30 % hermafroditas 70 % femeninas; 6 (Costillas Asimétricas), 30 % hermafroditas 70 % femeninas; 7 (Dextro Rafe), 50 % hermafroditas 50 % femeninas; 8 (Levo Rafe), 80 % hermafroditas 20 % femeninas; 9 (Pliegue definido), 20 % hermafroditas 80 % femeninas; 10 (Tetra Plegada), 80 % hermafroditas 20 % femeninas; 11 (Penta Plegada), 10 %

hermafroditas 90 % femeninas; 12 (Hexa plegada), 60 % femenina 40 % hermafroditas y 13 (Hepta Plegada) 50 % hermafroditas 50 % femeninas. Estos resultados de la floración nos indican que el sexo de las semillas de papaya variedad Maradol no se puede determinar con las características morfológicas de la semilla, esto no coincide con lo señalado por Magdalita y Mercado (2003), donde señalan que en las plantas femeninas la testa es de color café claro y tiene una raíz ramificada, mientras que las plantas masculinas presentan testa café oscuro y radícula recta.

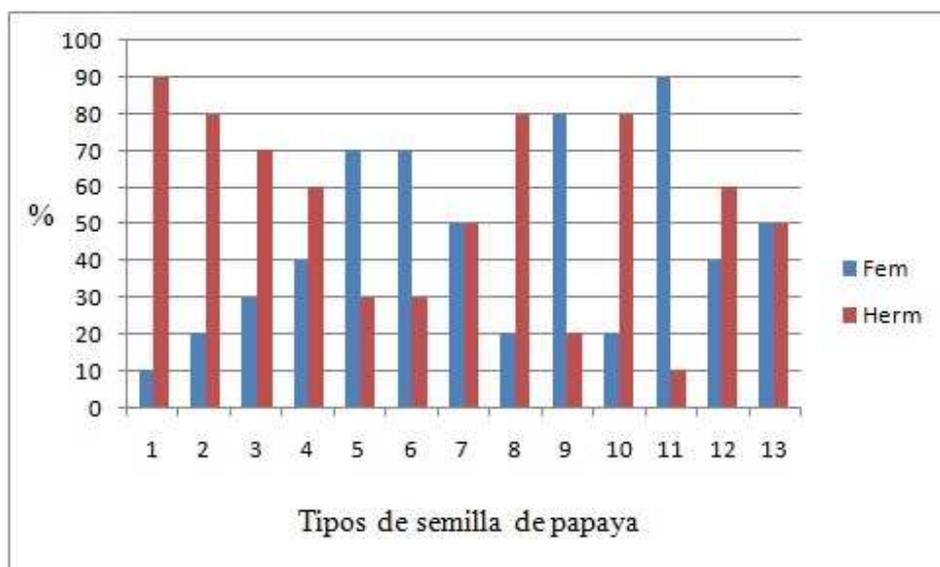


Figura 4. 5 Respuesta en porcentaje del sexado en plantas de papaya variedad Maradol. Fem (plantas femeninas); Herm (plantas hermafroditas).

4.2 Segundo Estudio

En el Cuadro 4.3 se anotan los resultados obtenidos con los tres iniciadores reportados en el Cuadro 3.1, en cuanto a su efecto en la amplificación de ADN de 2 plantas masculinas, 17 plantas hembra y 23 hermafroditas. Para el caso del iniciador T1, hubo amplificación en una planta masculina, todas las plantas femeninas, y solamente en cinco hermafroditas. Con el iniciador T12, se observó amplificación en todas las plantas hermafroditas y masculinas pero en ninguna hembra. Con el iniciador W11 se presentó un 100% de amplificación en plantas hermafroditas y nula en plantas hembras y masculinas. En las Figuras 4.6 y 4.7 se observa la amplificación específica para hermafroditas de los iniciadores T12 y W11, respectivamente, y la amplificación de T1 en hermafroditas.

Cuadro 4. 3 Comportamiento de tres iniciadores de PCR para SCAR en plantas masculinas, femeninas y hermafroditas variedad Maradol.

Iniciadores	Masculinas		Femeninas		Hermafroditas	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
T 1	1	1	0	17	18	5
T 12	2	0	0	17	23	0
W 11	0	2	0	17	23	0

En las Figuras 4.6 y 4.7 se observa la amplificación específica para hermafroditas de los iniciadores T12, W11 y T1.

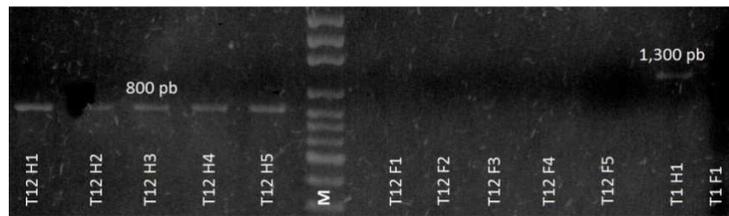


Figura 4. 6 Resultado de amplificación con los iniciadores T1 y T12 en plantas hermafroditas (H) de papaya variedad Maradol.

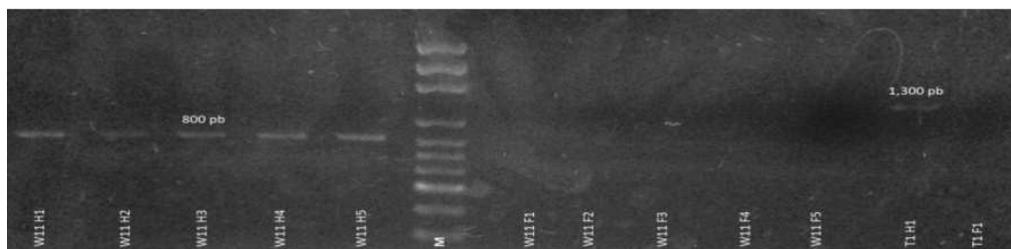


Figura 4. 7 Resultado de amplificación con los iniciadores T1 y W11 en plantas hermafroditas (H) de papaya variedad Maradol.

En la Figura 4.8 se observa la amplificación específica para hermafroditas y masculinas de los iniciadores T1 y T12 respectivamente y la amplificación de W11 solo en plantas hermafroditas.

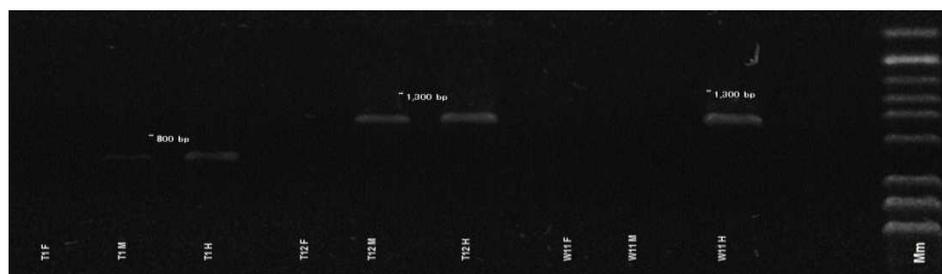


Figura 4. 8 Resultado de amplificación con los iniciadores T1, T12 y W11 en plantas Masculinas (M); Femeninas (F); y hermafroditas (H) de papaya variedad Maradol.

Como una validación del comportamiento de los iniciadores T12 y W11, se puede apreciar en la Figura 4.9 que ambos causaron amplificación de fragmentos en un compuesto de ADN de cinco plantas hermafroditas, mientras que no lo hicieron en un compuesto de ADN de cinco plantas hembra. Ambos fragmentos presentaron un tamaño aproximado de 800 pb, mientras que con T1 se obtuvo un tamaño aproximado de 1300 pb, lo cual coincide con lo reportado por Deputy *et al.* (2002).

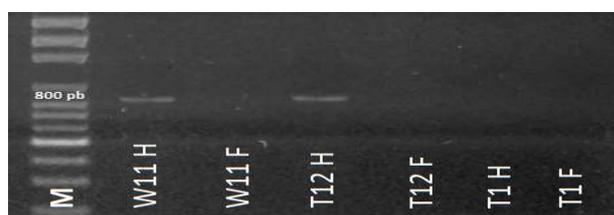


Figura 4. 9 Resultado de amplificación en “Compuestos” de ADN proveniente de 5 plantas femeninas (F) y 5 plantas hermafroditas (H) con los iniciadores T1, T12 y W11.

De estos resultados se infiere que el iniciador T1 no amplifica en todas las plantas femeninas y lo hace de manera poco consistente en plantas hermafroditas, ya que se presentan falsos negativos. Esto difiere de lo encontrado por Deputy *et al.* (2002), quienes obtuvieron amplificación con T1 para los tres tipos sexuales y lo reportado por Sánchez y Nuñez (2008) que tuvieron fragmentos de amplificación que medían 1,300 pb con T1 en plantas masculinas y hermafroditas de cultivares colombianos.

La prueba exacta de Fisher indicó una asociación sumamente significativa de los sexos femenino y hermafrodita con los marcadores T12 y W11 ($p = 1.27 \times 10^{-11}$). En tanto, la misma prueba también arrojó un resultado altamente significativo para T1 ($p = 3.25 \times 10^{-7}$). Sin embargo, como se observa para T1, no hay consistencia en la amplificación de ADN de plantas hermafroditas.

Ya que los iniciadores de T12 y W11 amplificaron consistentemente segmentos de ADN en los materiales de papaya hermafrodita, mientras que no lo hicieron para los materiales femeninos, proveen de un método adecuado para discriminación entre los dos tipos sexuales. Esto puede ser de amplia utilidad en papaya Maradol, ya que en este cultivar lo que se requiere es discriminar entre hembras y hermafroditas, porque las plantas masculinas están ausentes o con muy baja frecuencia. Las propiedades de amplificación de T12 y

W11 concuerdan con lo reportado por Deputy et al. (2002) para variedades hawaianas, con Sánchez y Nuñez (2008) para variedades colombianas, con Magdalia y Mercado (2003) en Filipinas para híbridos Cariflora por Cavite y con Saalau et al. (2009) en Costa Rica para el híbrido Pococí.

Los resultados obtenidos con los iniciadores T12 y W11 constituyen la base para el diseño de una metodología rápida que permita la identificación del sexo en plántulas de papaya variedad Maradol a muy temprana edad. Por otro lado el iniciador T1 no resulta ser útil como discriminante del sexo ni como testigo en la variedad de papaya Maradol.

La consistencia en la propiedades de amplificación de los iniciadores T12 y W11, a través de variedades hawaianas, filipinas, costarricenses y colombianas y, como lo revela este trabajo, en la papaya Maradol, refuerza la idea de que la región de determinación sexual en papaya es extensa, y que se trata de verdaderos cromosomas sexuales.

V. CONCLUSIONES

La semilla de papaya variedad Maradol tienen características morfológicas similares en su forma ovoide, un color marrón oscuro en su estado de madurez, testa pétrea, cuentan con un diámetro polar entre 5 y 6 mm, un diámetro ecuatorial entre 4 y 4.5 mm. Pero presentan características particulares que hacen una gran tipografía de morfologías en las semillas, dando lugar a 13 tipos de formas considerando la cubierta seminal, forma de rafe, número de pliegues o surcos en la testa, las cuales hacen difícil tener una descripción morfológica general de la semilla de papaya variedad Maradol. Ninguno de los 13 tipos de formas de semilla encontrados en los frutos de papaya obtuvo el 100 % de plantas hermafroditas, femeninas o masculinas, por lo tanto, con el estudio morfológico de las semillas no se puede determinar el sexo de las plantas de *C. papaya* variedad Maradol.

Dos juegos de iniciadores para marcadores tipo SCAR, T12 y W11, amplificaron bandas de 800 pb con especificidad completa en plantas hermafroditas de la variedad Maradol, sin casos de falsos positivos. Por lo tanto pueden ser usados como base para implementar un método rápido de

identificación del sexo en esta variedad, con fines de selección de plántulas. En cambio, la inconsistencia observada para el juego de iniciadores T1, descarta su uso tanto como testigo como en la identificación del sexo en este tipo de material.

VI. LITERATURA CITADA

- Alonso-Esquivel, M., M. Bautista-Alor, M. Ortiz-García, A. Quiroz-Moreno, W. Rohde y L. F. Sánchez-Teyer. 2009. Caracterización de accesiones de papaya (*Carica papaya* L.) a través de marcadores AFLP en Cuba. *Colomb. Biotecnol.* 11:31-39.
- Augstburger, F., J. Berger, U. Censkowsky, P. Heid, J. Milz y C. Streit. 2000. Agricultura Orgánica en el Trópico y Subtrópico. Guías de 18 Cultivos. Papaya. Asociación Naturland. Gräfelfing Alemania. 5-6.
- Chaves-Bedoya, G., M. Pulido, E. Sánchez-Betancourt y V. Núñez. 2009. Marcadores RAPD para la identificación del sexo en papaya (*Carica papaya* L.) en Colombia. *Agron. Colomb.* 27:145-149.
- Colima Produce. 2010. Papaya perfil comercial. Secretaría de Desarrollo Rural Dirección de Comercialización y Planeación del Estado de Colima. 1.
- Contreras, S. 2012. Fundamentos de la producción de semillas I: Genética, mejoramiento y producción de semillas. Departamento de Ciencias Vegetales Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Deputy, J.C., R. Ming, H. Ma, Z. Liu, M. M. M. Fitch, M. Wang, R. Manshardt y J. I. Stiles. 2002. Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106:107-111.
- Doyle J.J. y J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 1991;1,13-15.

- Flores-Sánchez, G.O. 2005. Evaluación de sustratos para la producción de plántula (*Carica papaya*), en el Subín la libertad Peten. Universidad de San Carlos de Guatemala, Centro Universitario de Peten.1-8.
- Garcia, D., J. N. Fitz-Gerald and F. Berger. 2005. Maternal control of integument cell elongation and zygotic control of endosperm growth are coordinated to determine seed size in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 52-60.
- Gil, A. I. y D. Miranda. 2008. Aspectos anatómicos de la semilla de papaya (*Carica papaya* L.). *Rev. Colomb. Cienc. Hortic.* 2:145-156.
- Gil, A. I. y D. Miranda. 2005. Morfología de la flor y la semilla de papaya (*Carica papaya* L.): Variedad Maradol e híbrido Tainung - ¹. *Agron. Colomb.* 23:218-222.
- Ingouff, M., P.E. Julien and F.Berger. 2006. The female gametophyte and the endosperm control dell proliferation and differentiation of the seed coat in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 18:3491-3501.
- International Seed Testing Association (ISTA). 2009. In Glattbrugg (Zurich), Switzerland. http://www.seedtest.org/en/ista-annual-meeting-2009-_content---1--1267--495.html Fecha de consulta: Noviembre 19, 2012.

- Leython, S. y D. Jáuregui. 2008. Morfología de la semilla y anatomía de la cubierta seminal de cinco especies de *Calliandra* (Leguminosae-Mimosoidae) de Venezuela. Rev. Biol. Trop. 56:1075-1085.
- Magdalita, P. and C. Mercado. 2003. Determining the sex of papaya for improved production. Food and fertilizer technology center for the Asian and Pacific Region. University of Philippines, Los Bolaños, Filipinas. 6 .
- Nakaune, S., K. Yamada, M. Nondo, T. Kato, T. Satoshi, M. Nishimura and I. Hara-Nishimura. 2005. A vacuolar processing enzyme, VPE, is involved in seed coat formation at the early stage of seed development. Plant Cell. 17: 876-887.
- Perisse, P., R. J. Lovey, C.V. Arias, M. Scandaliaris y M. L. Molinelli. 2011. Morfología de semilla y plántula de *Dicliptera* Nees (Acanthaceae) como fuente de caracteres para su identificación y su relación con estructuras de supervivencia. YTON Revista Internacional de Botánica Experimental. 80:73-78.
- Abel-Reboucas S.J., 2000. Aspectos sobre la producción de la papaya. United States Agency for International Development Managua, Nicaragua. 4-9.
- Rodríguez-Amaya, R., S. Montes-Hernández, J.A. Rangel-Lucio, M. Mendoza-Elos y L. Latournerie-Moreno. 2009. Caracterización morfológica de la

calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* Huber). *Agricultura Técnica en México*. 35:378-388.

Rodríguez-Manzano, A. 2008. De la ciencia popular a la industria: la variedad cubana de papaya "Maradol". *Observatorio de Ciencia tecnología e innovación*. Consejo de Ciencia y Tecnología, Estado de Guanajuato, México. 1-22.

Saalau-Rojas, E., W. Barrantes-Santamaría, C. L. Loría-Quirós, A. Brenes-Angulo y L. Gómez-Alpizar. 2009. Identificación mediante PCR del sexo de la papaya (*Carica papaya* L.), híbrido "Pococi". *Agron. Mesoam.* 20:311-317.

Sánchez-Betancourt, E. y V. M. Núñez-Zarantes. 2008. Evaluación de marcadores moleculares tipo SCAR para determinar sexo en plantas de papaya (*Carica papaya* L.). *Corpoica*. 9:31.

SAS Institute. 2002. *The SAS System for windows*. Version 9.0.

Schruff, M., M. Spielman, S. Tiwari, S. Adams, N. Fenby and R. Scott. 2006. The auxin response factor 2 gene of *Arabidopsis* links auxin signaling, cell division, and the size of seed other organs. *Development*. 133:251-261.

Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera SIAP, SAGARPA. 2012. Consulta de indicadores de producción nacional, precios y márgenes de comercialización de papaya.

Sistema de Información de Organismos Vivos Modificados (SIOVM). 2012. Proyecto GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad. CONABIO. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20898_sg7.pdf. Fecha de consulta: Diciembre 10, 2012.

Urasaki, N. K. Tarora, A. Shudo, H. Ueno, M. Tamaki, N. Miyagi, S. Adaniya y H. Matsumura. 2012. Digital transcriptome analysis of putative sex-determination genes in papaya (*Carica papaya*). PLoS ONE 7:1-9.

Urasaki, N., M. Tokumoto, K. Tarora, Y. Ban, T. Kayano, H. Tanaka, H. Oku, I. Chinen y R. Terauchi. 2002. A male and hermaphrodite specific RAPD marker for papaya (*Carica papaya* L.). Theoretical and Applied Genetics 104:281-285.

Valle-Gallo, C. 2008. Calidad fisiológica y efecto de la presencia de semillas verdes de soja (*Glicine max* L.) en lotes destinados a simientes. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. 45.